

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005677

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-108449  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 July 2005 (14.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

20.6.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 8 4 4 9

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

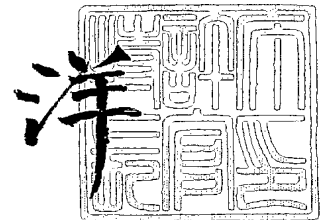
J P 2 0 0 4 - 1 0 8 4 4 9

出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所  
特許技術開発株式会社

2 0 0 5 年 6 月 1 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 PPTD04-003  
【提出日】 平成16年 3月31日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫殿  
【国際特許分類】 A61K 7/06  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番地1 独立行政法人産業技術総合研  
    究所つくばセンター内  
    【氏名】 岡 修一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番地1 独立行政法人産業技術総合研  
    究所つくばセンター内  
    【氏名】 鶴田 明稚  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番地1 独立行政法人産業技術総合研  
    究所つくばセンター内  
    【氏名】 河野 泰広  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区余丁町14-4 NH市ヶ谷ビル3階 特許技術開  
    発株式会社内  
    【氏名】 鈴木 三男  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区余丁町14-4 NH市ヶ谷ビル3階 特許技術開  
    発株式会社内  
    【氏名】 中里 敏  
【特許出願人】  
    【識別番号】 301021533  
    【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
    【代表者】 吉川 弘之  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502316706  
    【氏名又は名称】 特許技術開発株式会社  
    【代表者】 阿形 明  
【代理人】  
    【識別番号】 100095153  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 水口 崇敏  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 214010  
    【納付金額】 6,300円  
【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 30/100  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

一般式



(式中の X はヒドロキシル基含有アミノ酸単位である)

で表わされる新規水溶性ポリペプチド及びその水溶性塩。

## 【請求項 2】

式中の X が S e r 又は T h r である請求項 1 記載の新規水溶性ポリペプチド及びその水溶性塩。

## 【請求項 3】

配列表配列番号 1 で表わされる請求項 1 又は 2 記載の新規水溶性ポリペプチド及びその水溶性塩。

## 【請求項 4】

分子構成単位として、一般式



(式中の X はヒドロキシル基含有アミノ酸単位である)

で表わされるペントペプチド単位を含む水溶性ポリペプチド又はその水溶性塩を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤。

## 【請求項 5】

式中の X が S e r 又は T h r である請求項 4 記載の上皮系細胞増殖促進剤。

## 【請求項 6】

一般式で表わされるペントペプチド単位が  
配列表配列番号 1  
単位である請求項 4 又は 5 記載の上皮系細胞増殖促進剤。

## 【請求項 7】

ポリペプチドが配列表配列番号 1 で表わされるペントペプチドである請求項 6 記載の上皮系細胞増殖促進剤。

## 【請求項 8】

育毛剤である請求項 4 ないし 7 のいずれかに記載の上皮系細胞増殖促進剤。

## 【請求項 9】

毛髪休止期に作用する請求項 8 記載の育毛剤。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】新規ペントペプチド及びそれを用いた上皮系細胞増殖促進剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、上皮系細胞増殖促進効果、例えば育毛促進効果、皮膚再生促進効果、皮膚潰瘍治療効果、粘膜損傷治療効果などを有する新規な水溶性ポリペプチド、その水溶性塩及びそれらを有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

最近、発毛、脱毛の制御機構（メカニズム）が明らかにされるとともに、育毛剤に対する社会的関心が強まり、育毛作用を有する新規化合物、遺伝子研究に基づく成分、漢方の組合せなど種々の新しい育毛剤が提案されている。

## 【0003】

図1は、発毛、脱毛を繰り返す毛髪の毛周期（ヘアサイクル）を示す説明図であるが、通常の毛髪はその本体1の毛根部2に毛乳頭3を有し、その上部に毛母細胞4を備えており、成長後毛髪本体1は退縮期（Catagen）となり、約2～3週間で成長が停止し、その後2～3か月間休止期（Telogen）に入る。その間に毛根部2は活動을続け、新しい毛髪本体1'を発生する。この新しい毛髪本体1'は引き続き成長期（Anagen）に入り、古い毛髪本体1を脱毛させて、さらに成長を維持し、約5～6年で元の毛髪を再生する。

## 【0004】

育毛剤は、このようなヘアサイクルの各時期において、毛母細胞の増殖を促進し、休止期において成長期を誘導したり、成長期を延長したり、退縮期への移行を遅延させる作用を有し、発毛の促進又は脱毛の抑制を行わせるものである。

## 【0005】

そして、このような育毛剤として、これまでに、例えば6-(1-ピペリジニル)-2,4-ピリミジンジアミン-3-オキシド（ミノキシジル）を有効成分とした育毛剤（特許文献1参照）、ミノキシジル1～6質量%と、多価アルコール、エタノール、塩酸ピリドキシン及び水を含有してなる育毛組成物（特許文献2参照）、繊維芽細胞増殖因子-10（FGF-10）を有効成分として含む育毛剤（特許文献3参照）、特定の脂肪酸エステル、エーテル、モノグリセリド硫酸エステル塩又はモノアルキルグリセリルエーテル硫酸エステル塩を有効成分とする養毛剤（特許文献4参照）、CRF1受容体アンタゴニストを有効成分とする育毛剤（特許文献5参照）、血行促進効果を有する生薬抽出物とビタミン又はその誘導体とを有効成分とし、水溶性高分子が配合されてゲル化されたエアゾール用組成物と、噴射剤とを含有する育毛用エアゾール製剤（特許文献6参照）などが提案されている。

## 【0006】

また、特殊なものとして、式  $R^1\text{-Met-Ile-XR}^2$ （式中、XはTrp、Phe、Trp-Leu、Phe-Leu、Tyr-Leu、Ile-Leu又はLeu-Leuであり、 $R^1$ は水素原子、アミノ基の保護基、 $R^2$ はヒドロキシ又はカルボキシル基の保護基である）で表わされるペプチド又は薬理的に許容される塩を有効成分とする経口育毛剤が知られている（特許文献7参照）。

そのほか、極く最近の新聞情報として、6-ベンジルアミノプリン（サイトプリン）とペントデカンとを組み合わせた育毛剤「薬用毛髪力 イノベート」の発売が報じられている（非特許文献1参照）。

## 【0007】

これらの育毛剤は、それぞれ長所を有し、かなりの効果が認められているものもあるが、すべての症状に対して完全に対応し得るものではない上に、原料の入手が困難なものもあり、実用に供するには必ずしも満足できるものとはいえない。このため、この分野においてはさらに優れた効果を発揮する新規な育毛剤の出現が要望されている。

## 【0008】

- 【特許文献1】 米国特許第4139619号明細書（特許請求の範囲その他）  
【特許文献2】 特開2002-326913号公報（特許請求の範囲その他）  
【特許文献3】 特開平10-279501号公報（特許請求の範囲その他）  
【特許文献4】 特開平11-246359号公報（特許請求の範囲その他）  
【特許文献5】 国際公開第02/019975号パンフレット（特許請求の範囲その他）  
【特許文献6】 特開平7-101834号公報（特許請求の範囲その他）  
【特許文献7】 国際公開第00/29425号パンフレット（特許請求の範囲その他）  
【非特許文献1】 日経産業新聞、平成16年3月2日

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明は、比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規な化合物を提供することを目的としてなされたものである。

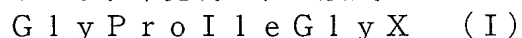
## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明者らは育毛剤として有用な化学物質を開発するために鋭意研究を重ねた結果、バチルス（*Bacillus*）属バクテリアの培養上清の抽出物中に、優れた育毛効果を示す活性物質が存在することを見出した。そして、この活性物質について、さらに研究を重ねた結果、育毛作用がこの活性物質中の特定のオリゴペプチド構造に起因すること、しかもこのオリゴペプチド構造を有する特定のポリペプチドは、いずれも所望の育毛効果を示すだけでなく、皮膜移植、皮膚潰瘍や老化皮膚復元の際の細胞再生を促進する効果を示すことを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

## 【0011】

すなわち、本発明は、一般式



（式中のXはヒドロキシル基含有アミノ酸単位である）

で表わされる新規水溶性ポリペプチド及びその水溶性塩、分子構成単位として、前記一般式（I）で表わされるペンタペプチド単位を含む水溶性ポリペプチド又はその水溶性塩を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤を提供するものである。

## 【0012】

本発明の上皮系細胞増殖剤におけるペンタペプチドの作用は、このペンタペプチドそのものだけでなく、このペンタペプチド単位をその分子構成単位として有するポリペプチドにおいても発揮されるが、分子量が500以上になると水に難溶になるので育毛剤としては好ましくない。

## 【0013】

本発明における前記一般式（I）の水溶性ペンタペプチド又はこれを分子構成単位として含む水溶性ポリペプチドは、遊離形のものであってもよいし、また水溶性塩であってもよい。この水溶性塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩などがある。

## 【0014】

本発明のペンタペプチド又はこれを分子構成単位として含むポリペプチドは、ポリペプチド合成の際にペプチド結合を形成する場合に慣用されている方法、例えば縮合剤法、活性エステル法、アジド法、混合酸無水物法などにより $\alpha$ -アミノ基を保護した原料アミノ酸とカルボキシル基を保護したアミノ酸とを反応させてペプチドを形成したのち、保護基を脱離する工程を繰り返すことによって製造することができる。

## 【0015】

この縮合剤法は、最も一般的なペプチド結合の形成方法であって、この際の縮合剤としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC)、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (WSC I) 及びその塩酸塩 (WSC I · HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロリ化合物塩 (BOP)、ジフェニルホスホリルジアジド (DPPA) などを単独で、或いは、N-ヒドロキシスクシンイミド (HONSu)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、又は3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン (HOObt) と組み合わせて用いる。

## 【0016】

活性エステル法における活性エステルとしては、例えばp-ニトロフェニルエステル (ONp)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ONSu)、ペンタフルオロフェニルエステル (OPfp) などを用いる。

また、アジド法は、アミノ酸又はペプチドに無水ヒドラジンを反応させて対応するヒドラジドを形成させる方法であり、ラセミ化の少ないセグメント縮合法として知られている。

## 【0017】

さらに、混合酸無水物法は、イソブチルオキシカルボニルクロリド、塩化ジエチルアセチル、塩化トリメチルアセチルなどを用いてアミノ酸のカルボキシル基の混合無水物を形成させる方法で、低温においてカルボキシル基を強力に活性化できるので有利である。

## 【0018】

他方、アミノ酸の保護基としては、酸処理や加水分解や接触還元により容易に脱離するものが用いられる。このような保護基のうち $\alpha$ -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基、メトキシベンジルオキシカルボニル基などがある。また、カルボキシル基を保護するには、メチル又はエチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、フェナシルエステルなどを形成させる。

## 【0019】

また、側鎖にヒドロキシル基をもつ $\alpha$ -アミノ酸すなわち一般式 (I) 中のXの場合は、このヒドロキシル基を保護する必要があるが、この保護基としては、白金黒触媒による接触還元や強酸処理により容易に脱離されるベンジル基や弱酸処理により容易に脱離されるtert-ブチル基が好適である。

このような $\alpha$ -アミノ酸エステル、アミノ基やヒドロキシル基を保護された原料アミノ酸は、市販品として容易に入手可能である。

## 【0020】

本発明のペプタペプチド又はこれを分子構成単位として含むポリペプチドの製造は、原料アミノ酸又はその誘導体を溶媒中に均一に溶解して反応させる液相法、不溶性の樹脂上でペプチド鎖を伸長させていく固相法のいずれでも行うことができるが、自動固相合成装置を用いて行うのが有利である。この方法によると、所望のペプタペプチド又はポリペプチドを短時間に、しかも高純度で得ることができる。

## 【0021】

本発明の一般式 (I) で表わされるペプタペプチド又はその水溶性塩としては、例えばグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン、グリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニン及びそれらのナトリウム塩、カリウム塩又はアンモニウム塩などがある。

## 【0022】

また、これらのペプタペプチドを分子構成単位として含むポリペプチドの中では、これらのペプタペプチド単位をカルボキシル基末端に有するポリペプチド例えばアラニルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン、セリルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン、グリシルセリルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン及びそれらのナ

トリウム塩、カリウム塩又はアンモニウム塩などが好ましい。これらのポリペプチドは、分子量500以下、特に450以下であることが、水に溶解しやすいという点で好ましい。

#### 【0023】

本発明の新規ポリペプチド又はその水溶性塩は、ラセミ体として得られるが、所望ならば、慣用の方法により光学分割して光学活性を有するものとして得ることもできる。この光学分割は、ラセミ体のアミノ酸を適当な光学活性物質とのジアステレオマーを形成させ、これを分別結晶する方法、酵素を用いる方法又はキラルな担体を用いた高速液体クロマトグラフィーによる方法などで行うことができる。

#### 【0024】

本発明のポリペプチドは、水又はアルコール類に可溶である。このものは、質量分析、赤外吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）により、同定することができる。

#### 【0025】

このものは、毛包上皮細胞、特に毛母細胞を直接的に増殖促進させる作用、すなわち育毛作用を有するほかに、培養皮膚移植、皮膚潰瘍、皮膚欠損創の再生作用を有するので、上皮系細胞増殖促進剤として用いることができる。

#### 【0026】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤の製剤は、有効成分となる前記ポリペプチドを、水性媒質に0.0001～5質量%の濃度で溶解することにより行われる。この際用いる水性媒質としては、水と水溶性有機溶剤との混合溶媒が好ましい。

#### 【0027】

水溶性有機溶剤としては、例えばエチルアルコールのようなアルコール類、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン、1,3-ブチレングリコールのような多価アルコール類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのような極性有機溶剤などが用いられる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上組み合わせ用いてもよい。好ましい水性溶媒は、水とプロピレングリコールとエチルアルコールとの混合溶媒である。

#### 【0028】

この本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、所望に応じ他の育毛作用を有する化合物例えばミノキシジル、塩化カルプロニウム、ペンタデカン酸グリセリド、酢酸トコフェロール、ピロクトンオラミン、グリチルリチン酸、イソプロピルメチルフェノール、ヒノキチオール、センブリ抽出液、トウガラシチンキやビタミン類例えばビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンH、ビタミンK、ビタミンP、ビタミンU、パントテニルアルコール、カルチニン、フェルラ酸、 $\gamma$ -オリザノール、リポ酸、オロット酸又はそれらの誘導体と併用することができる。これらの化合物は、製剤中に0.5～10質量%の範囲の量で配合される。

#### 【0029】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、さらに所望に応じ、香料、着色剤、pH調整剤、殺菌剤、界面活性剤、噴射剤など、通常の外用液剤に慣用されている添加剤を加えることができる。これら添加剤の量としては、0.01～5質量%の範囲が好ましい。

#### 【0030】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、頭部又は患部に、1日1～5回程度塗布を繰り返して使用される。

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、毛包上皮細胞の増殖を用量依存的に促進させることからみて、この中の有効成分であるポリペプチドが上皮系細胞増殖促進効果を有することを確認することができた。

また、本発明のポリペプチドは上皮細胞に対して、選択的に増殖作用を示すので、他の細胞に対し、例えばガン化などの悪影響を与えるおそれがなく有利である。

#### 【発明の効果】



## 【0031】

本発明によると、育毛効果のみでなく、皮膚再生効果、アトピー性皮膚炎治療効果を奏する優れた新規な上皮系細胞増殖促進剤が提供される。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0032】

次に実施例によって本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0033】

自動固相合成装置（マルチシンテック社製、製品名「S y r o 2 0 0 0」）を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基を *tert*-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 $\alpha$ -アミノ基を 9-フルオレニルメトキシカルボニル基（以下 Fmoc 基と略す）で保護したグリシンと、 $\alpha$ -アミノ基を Fmoc 基で保護したイソロイシンと、 $\alpha$ -アミノ基を Fmoc 基で保護したプロリンと、 $\alpha$ -アミノ基を Fmoc 基で保護したグリシンとを順次反応させて、N-Fmoc-グリシルプロリル-イソロイシルグリシルセリンのベンジルエステルを製造した。

## 【0034】

反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒（体積比 3 : 1）の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約 40% であった。

## 【0035】

次に、このペントペプチドを C<sub>18</sub> カラム [スベルコ社製、製品名「Discovery C<sub>18</sub>」(4.6 × 250 mm)] に通し、吸着した成分を 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度 2 ~ 22% の範囲の溶液により、流速 1.5 ml/分、20 分間で溶出させた。その結果、ペントペプチドは保持時間 9.761 分で溶出され、純度は 96.9% であった。

## 【0036】

また、このペントペプチドの質量を、エレクトロスプレー法を用いた正イオン測定による LC-MS 質量計 [LC 部; アジレント社製、製品名「Agilent 1100 シリーズ」、MS 部; サーマエレクトロン社製、製品名「Thermo Finnigan LC Q Advantage (ソフトウェア Xcalibur)】で分析した結果、質量 ( $m/z$ , MH<sup>+</sup>) は  $m/z$  430.1 であることが分った。この質量分析の結果を図 2 に示す。

## 【実施例2】

## 【0037】

ヒドロキシル基を *tert*-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルの代りに、ヒドロキシル基を *tert*-ブチル基で保護したトレオニンのベンジルエステルを用いること以外は、実施例 1 と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニンを製造した。このものの質量 ( $m/z$ , MH<sup>+</sup>) は  $m/z$  444.3 であった。

## 【実施例3】

## 【0038】

実施例 1 で得たペントペプチド 1 mg を注射用水（大塚製薬社製、製品記号「057-00456」）300  $\mu$ l に溶解し、プロピレングリコール（和光社製、製品記号「161-05006」）200  $\mu$ l 及びエチルアルコール（和光社製、製品記号「057-00456」）500  $\mu$ l を加えて混合し、濃度 1 mg/ml の上皮系細胞増殖促進剤を調製した。

別に 7 週齢の C3H/He 系雌マウス 10 匹を 1 週間飼育し、馴化させたのち、毛周期

が休止期にあるマウスの背部毛を電気バリカン及び電気シェーバーを用いて剃毛して実験用動物とした。

#### 【0039】

次に、この実験用動物を5匹ずつの2グループに分け、剃毛後3日目から第1グループには1日1回剃毛部位に $100\mu\text{l}$ /匹の上皮系細胞増殖促進剤を塗布し、第2グループには、対照用として注射用水とプロピレングリコールとエチルアルコールの混合物（体積比3:2:5）のみを塗布した。塗布後14日目に剃毛部位をデジタルカメラで撮影した。その結果を図3（A）及び（B）に示す。この図から分るように、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ（B）は、対照グループ（A）に比べ明らかに発毛促進が認められる。

#### 【0040】

次に、この画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比（再生毛部位のピクセル数/剃毛部位のピクセル数）を百分率で算出した。有意差の検定は、スチューデントのt検定（アバカスコンセプツ社製ソフトウェア「スタットビュー J-4.02」）により行い、危険率5%未満（ $p < 0.05$ ）の場合、有意差ありとした。

その結果を図4に示したが、この結果によると、対照グループ（A）の再生毛面積比は、 $36.9\% \pm 5.7\%$ であるのに対し、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ（B）の再生毛面積比は $66.6 \pm 3.5\%$ であり、有意（ $p < 0.01$ ）に毛の再生が促進されることが分った。

#### 【実施例4】

##### 【0041】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤の細胞選択性を確認するために、以下のようにして皮膚組織に存在する細胞すなわち毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する細胞増殖作用の有無を調べた。

なお、培養培地、試験培地としては、以下のものを用いた。

##### 【0042】

###### （a）培養培地

DMEM（シグマ社製、製品記号「D-5523」）

FBS（カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」）10%

ペニシリン/ストレプトマイシン（ギブコ社製、製品記号「15140-122」）1%

###### （b）試験培地

MCD B153（シグマ社製、製品記号「M7403」）

インシュリン（シグマ社製、ウシ由来、製品記号「16634」）

$5\mu\text{g}/\text{ml}$

アポートランスフェリン（シグマ社製、ヒト由来、製品記号「T1147」）

$10\mu\text{g}/\text{ml}$

EGF（アップステート・バイオテクノロジー社製、マウス由来、製品記号「01-101」） $5\text{ng}/\text{ml}$

BPE（ギブコ社製、ウシ下垂体抽出物、製品記号「13028-014」）

$35\mu\text{g}/\text{ml}$

水溶性ヒドロコチゾン（ナカライ社製、製品記号「174-00」）

$0.5\mu\text{g}/\text{ml}$

エタノールアミン（和光社製、製品記号「012-12455」）

$100\mu\text{M}$

o-ホスホリルエタノールアミン（シグマ社製、製品記号「P0503」）

$100\mu\text{M}$

##### 【0043】

（1）毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞の調製

生後5日齢のC3H/HeN系新生仔マウスの皮膚を無菌的に採取し、手術用メスを用いて皮膚片を約2mm幅の短冊状のサンプルとした。5質量%のFBSを含むDMEM中に500U/mlのディスパーゼを溶かした溶液を調製し、この中に上記サンプルを浸し、4℃において16時間静置したのち、ピンセットを用いて皮膚片から表皮組織を剥離し、真皮組織と分離した。得られた表皮組織は表皮細胞の分離に、また真皮組織は毛包上皮細胞及び真皮繊維芽細胞の分離に供した。

#### 【0044】

このようにして得た真皮組織を(PBS)(-)に浸し、眼科バサミを用いて細切りし、5質量%のFBSを含むDMEM中に0.2質量%のコラゲナーゼを溶かした液に浸し、37℃において1時間消化した。このようにして得た真皮消化液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去したのち(PBS)(-)を加えて緩やかにピペティングし、真皮懸濁液を調製した。

#### 【0045】

次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行った。得られた毛球を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞分散溶液を調製した。

次に、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃で培養した。

#### 【0046】

他方、一回目の「静置→沈殿」の操作で上清に浮遊している真皮繊維芽細胞を回収し、1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた真皮繊維芽細胞を培養培地に分散させ、96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃で培養した。

#### 【0047】

上記の表皮組織を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした溶液に浸し、37℃において5分間処理することにより、表皮細胞分散液を調製した。

次いで、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去した。得られた表皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃において培養した。

また、ヒト毛乳頭細胞(トーヨーボー社製、製品記号「602-05」)を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃において培養した。

#### 【0048】

##### (2) 細胞増殖試験

##### (i) 試料の調製

実施例1で得たペントペプチド1mgを、試験培地232.8μlに加え、かきまぜて溶解することにより、10mM溶液を調製した。次いで、この10mM溶液を段階的に希釈し、100μM(No. 1)、30μM(No. 2)、10μM(No. 3)、3μM(No. 4)、1μM(No. 5)及び0.3μM(No. 6)濃度の6種類の試料を調製し、また対照としては試験培地のみを用いた。

#### 【0049】

##### (ii) 毛包上皮細胞及び表皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100μl/wellに加え、5%CO<sub>2</sub>含有雰囲気中、37℃において培養した。4日後、アラマブルー試薬(バイオソース社製、登録商標、製品記号「DAL1100」)を各wellに10μlずつ添加し、再び5%CO<sub>2</sub>含有雰囲気中、37℃において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシ

ステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長; 544 nm、測定波長; 590 nm)を測定し、細胞数を評価した。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定(アバカスコンセプト社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」)により行い、危険率5%未満( $p < 0. 05$ )の場合、有意差ありとした。

このようにして得られた毛包上皮細胞増殖試験結果を図5に、また表皮細胞増殖試験の結果を図6にそれぞれ棒グラフとして示す。

#### 【0050】

##### (iii) 真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をDMEM溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100  $\mu$ l/wellを加え、5%CO<sub>2</sub>含有雰囲気中、37℃において培養した。またこの際、陽性対照として培養培地を用いて同様に培養した。3日後、アラマブルー試薬(バイオソース社製、製品記号「341-077612」)を各wellに10  $\mu$ lずつ添加し、再び5%CO<sub>2</sub>含有雰囲気中、37℃において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長; 544 nm、測定波長; 590 nm)を測定し、細胞数を評価した。

このようにして得られた真皮繊維芽細胞試験の結果を図7に、毛乳頭細胞試験の結果を図8にそれぞれ棒グラフとして示す。

#### 【0051】

##### (iv) 結果

図5より、毛包上皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ101% (No. 6)、111% (No. 5)、124% (No. 4)、141% (No. 3)、142% (No. 2)及び141% (No. 1)であり、1  $\mu$ M濃度以上で有意差( $p < 0. 01$ )が認められた。

このことから、本発明の上皮細胞増殖促進剤は1  $\mu$ Mから用量依存的な毛包上皮細胞増殖促進作用を示すことが分った。

#### 【0052】

図6より、表皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ102% (No. 6)、110% (No. 5)、118% (No. 4)、124% (No. 3)、127% (No. 2)及び127% (No. 1)であり、1  $\mu$ M濃度以上で有意差(1  $\mu$ Mの場合 $p < 0. 05$ 、3  $\mu$ M以上の濃度の場合 $p < 0. 01$ )が認められた。

このことから、本発明の上皮細胞増殖促進剤は毛包上皮細胞に加えて表皮細胞に対してもまた1  $\mu$ Mから用量依存的な増殖促進作用を示すことが分った。

#### 【0053】

一方、図7及び図8から、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分かる。

これらの事実より、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞及び表皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すことが分った。このように、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、塗布剤例えばローション剤として用いた場合に、皮膚組織を構成する上皮系細胞以外の細胞に影響を及ぼさない。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0054】

本発明の化合物は、上皮系細胞増殖促進剤として、育毛用、皮膚再生用に利用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0055】

【図1】毛髪の発毛、脱毛のサイクルを示す説明図。

【図2】実施例1で得たペンタペプチドのマスマスペクトル。

【図3】本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)及び対照グループ(A)の14日目の剃毛部位をデジタルカメラで撮影した写真図。



【図 4】図 3 の画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比を百分率で算出した図。

【図 5】毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフ。

【図 6】表皮細胞の細胞増殖率を示す棒グラフ。

【図 7】真皮繊維芽細胞の細胞増殖率を示す棒グラフ。

【図 8】毛乳頭細胞の細胞増殖率を示す棒グラフ。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology;  
Patent Technology Development Inc

<120>Novel pentapeptide and epitheliocyte growth accelerator using same

<130>PPTD04-003

<160>1

<210>1

<211>5

<212>PRT

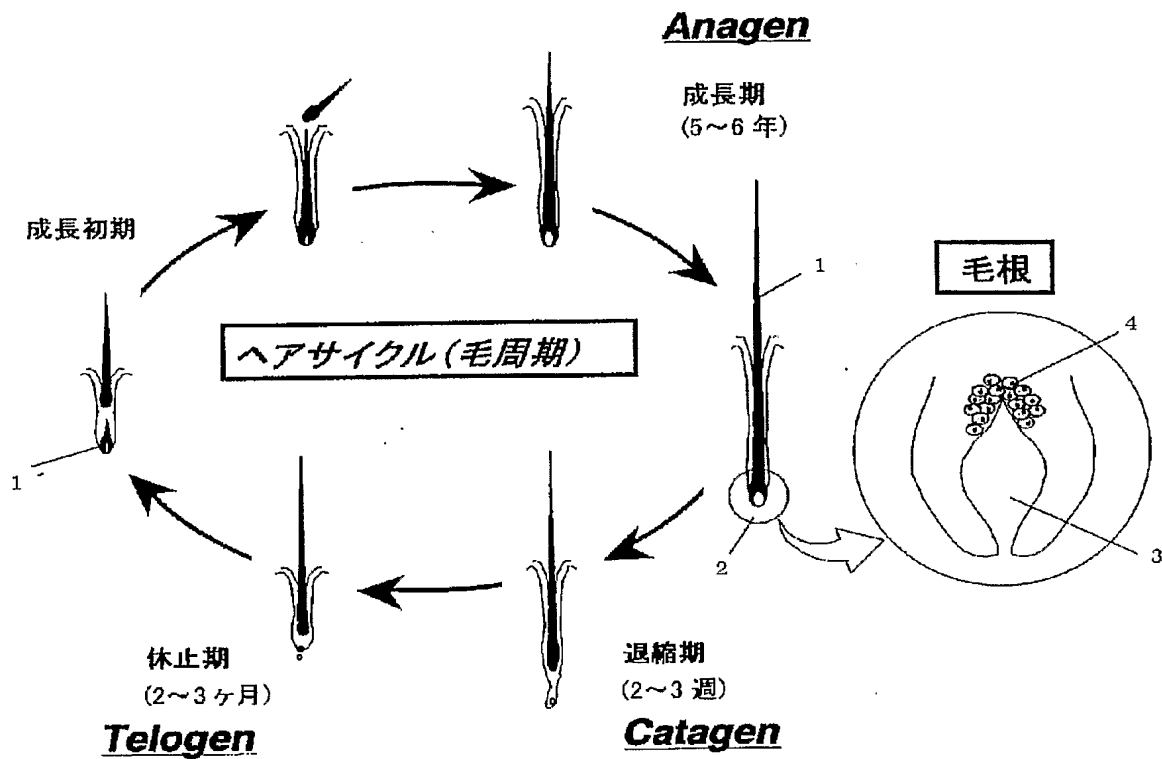
<213>Artificial

<400>1

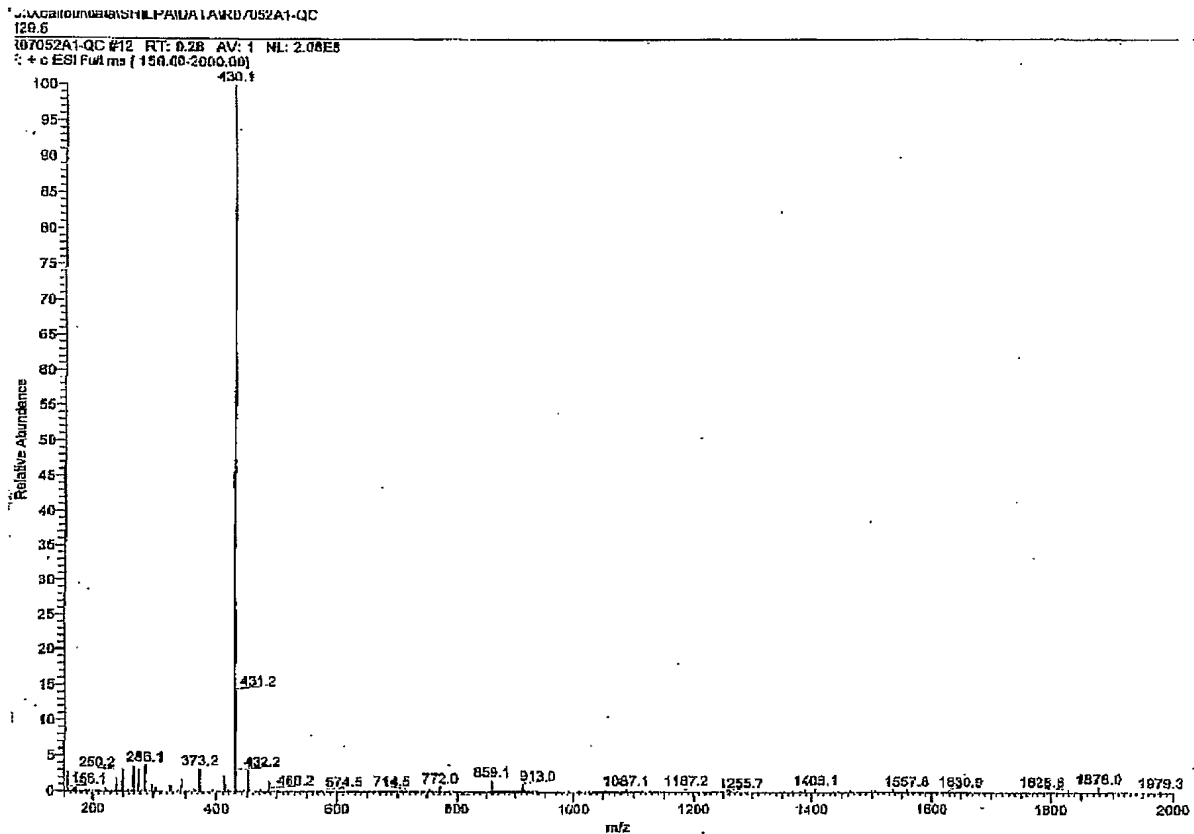
GlyProIleGlySer

1 5

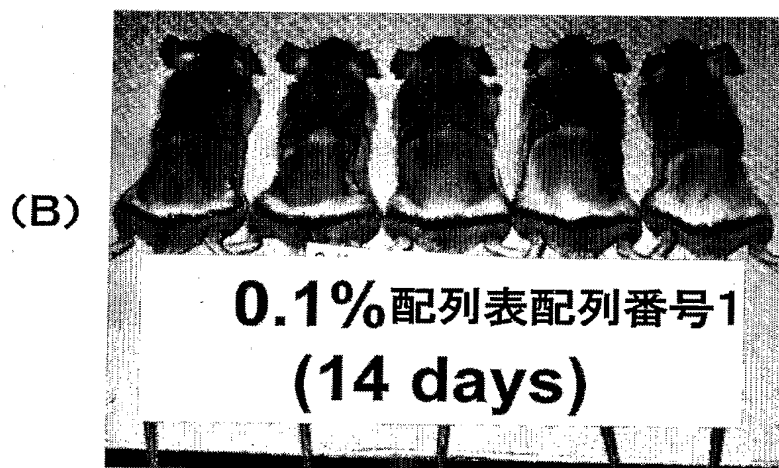
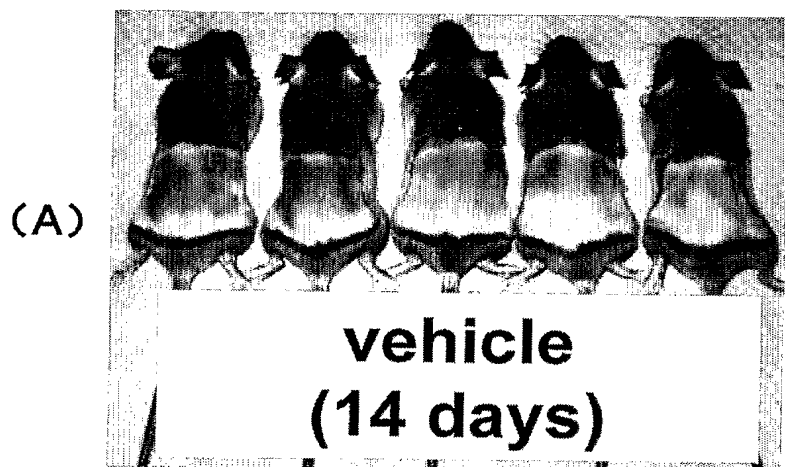
【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】

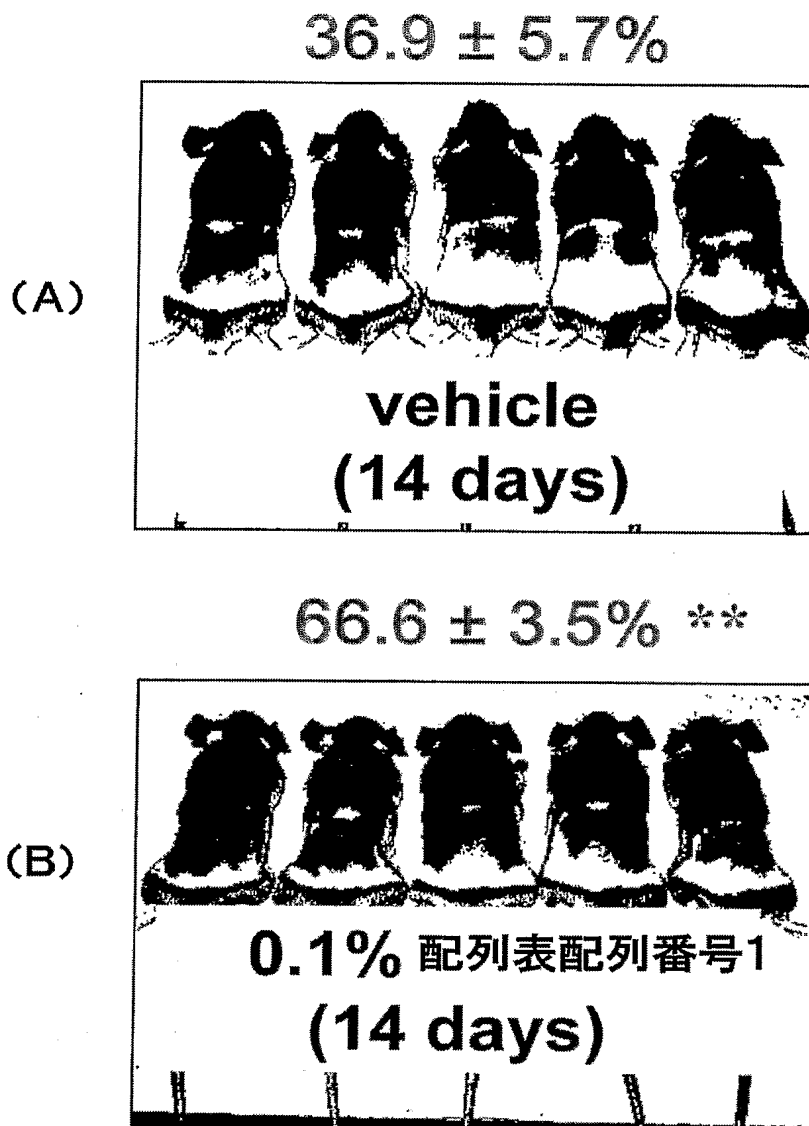


【図 3】

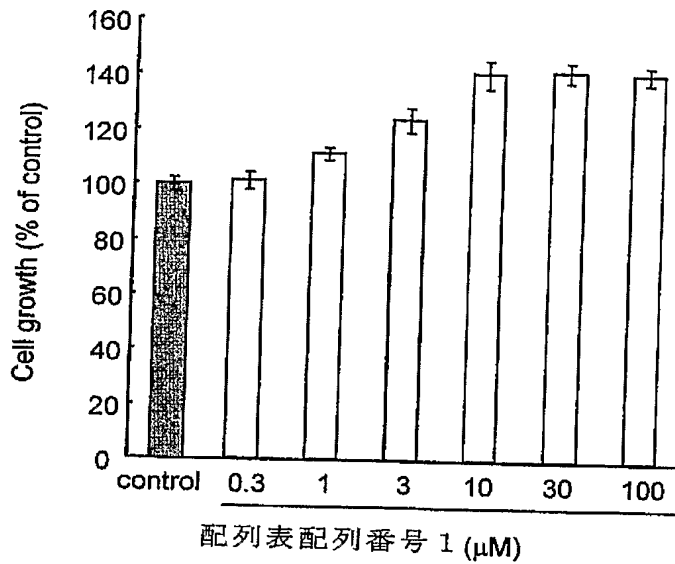




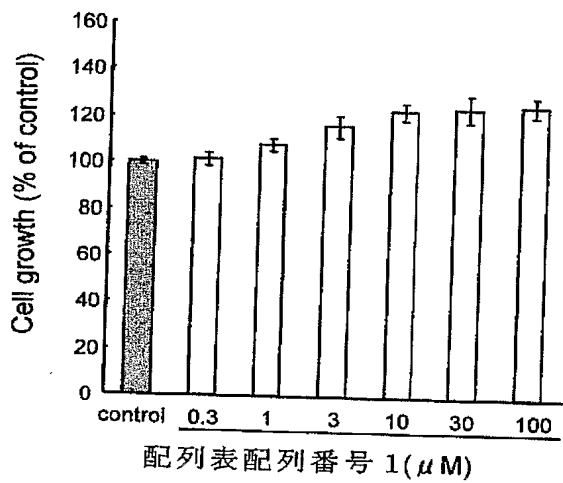
【図 4】



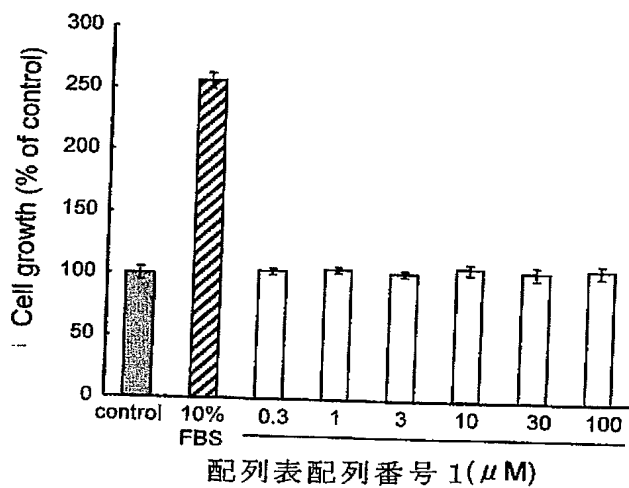
【図 5】



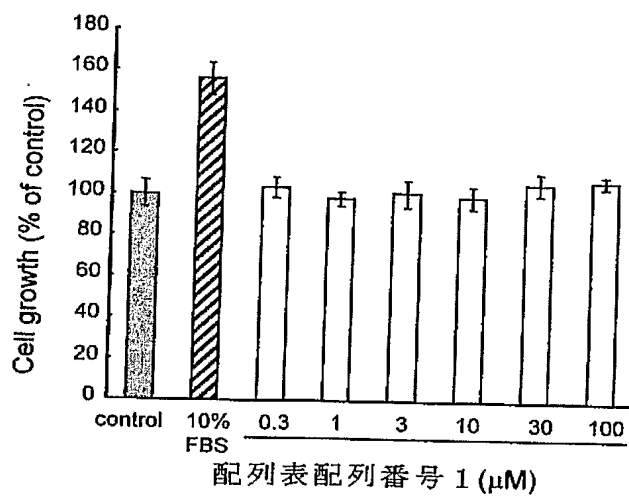
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規な化合物を提供する。

【解決手段】

一般式

G l y P r o I l e G l y X

(Xはヒドロキシル基含有アミノ酸単位)

で表わされる新規水溶性ポリペプチド及びその水溶性塩とする。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 0 8 4 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 1 0 8 4 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 2 3 1 6 7 0 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区余丁町 1 4 - 4 N H 市ヶ谷ビル 3 階

氏 名

特許技術開発株式会社